

EFFECTOS DE LA PENTOXIFILINA Y LA CAFEÍNA SOBRE LA MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS CRIOPRESERVADOS

Adolfo de la Vega C., Osvaldo Wilde R. y M. Cruz L.*

EFFECT OF PENTOXIFYLLINE AND CAFFEINE ON MOTILITY OF FROZEN BOVINE SPERMATOZOA

Stimulating effects of caffeine (C₈H₁₀N₄O₂) and pentoxifylline (C₁₃H₁₈N₄O₃) on the recently ejaculated spermatozoos motility are known. However, previous studies showed that 6 mM of caffeine were not efficient when utilized on frozen bovine semen.

In this research, 10 mM and 6 mM pentoxifylline concentrations, and the same of caffeine, were proved, by addition in a widely used "in vitro" fertilization (IVF) culture medium, TCM 199.

A "pool" of six bulls semen pills were defrosted, two pills for time, in five repetitions. Reconstituted semen was placed in water bath at 37°C, and was observed in different post-defrosted times (0', 15', 30', 60', 120', 180'). The motility and vigor cells percentages were determined, with a scale of 5 points.

Statistical analysis was carried out by means of an ANOVA for a completely randomized design and then subsequently a Duncan's test was done.

The results suggest that starting from 30', significant differences in motility would exist among treatments with pentoxifylline and with 10 mM of caffeine respect to witness and to 6 mM of caffeine, and that starting from the 120', similar answer is observed about vigor. Significant differences were observed between the different caffeine concentration treatments, but they were not found for pentoxifylline.

The conclusion is that the addition of 6 mM of pentoxifylline or 10 mM of caffeine would allow to prolong the viability of frozen semen subsequently to its reconstitution. These results are interesting for its usage in IVF.

Palabras clave: semen bovino, criopreservación, pentoxifilina, cafeína, hiperactividad.

Key words: bovine sperm, criopreservation, pentoxifylline, caffeine, hyperactivity.

INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido el efecto estimulador de las metilxantinas sobre la motilidad y el vigor de los espermatozoides frescos (Garbers y col., 1971a), aunque 6 mM de cafeína producen efectos positivos sobre el incremento de la motilidad del semen bovino fresco (datos no publicados), esta concentración no resultó efectiva para el semen congelado de la misma especie (Wilde y col., 1989/90) (Wilde y col., 1996).

El uso de semen congelado en fertilización *in vitro* (FIV) es una práctica muy difundida en producción animal, el mismo se maneja habitualmente en medios de cultivo enriquecidos que permiten mantener su viabilidad por tiempos relativamente prolongados.

Resultaría de importancia para trabajos de FIV contar con sustancias que produzcan un real efecto estimulador sobre espermatozoides criopreservados, dado que una buena y prolongada motilidad permitiría realizar con mayores probabilidades de éxito los trabajos previos de acondicionamiento del semen para la fertilización.

A fin de determinar si es posible obtener un comportamiento similar al observado en semen fresco, alcanzando niveles significativos de hiperkinesis, se utilizaron concentraciones mayores de cafeína y se probó un nuevo agente perteneciente a las metilxantinas, la pentoxifilina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó semen congelado en pellets, proveniente de seis toros de la raza Criolla Argentina, constituyéndose un "pool" de pastillas. De éste se extrajeron dos para cada repetición diluyéndose en 2 ml del medio, a

*Facultad de Agronomía y Zootecnia - Universidad Nacional de Tucumán, Casilla de Correo 125 - Av. Roca 1900 (4000) S.M. de Tucumán.

fin de minimizar los efectos derivados de toros y pastillas. De este preparado se tomó una alícuota de 1 ml y se rediluyó en 3 ml del mismo medio para lograr una dilución tal que permita una óptima visualización al microscopio óptico.

Se llevaron a cabo cinco tratamientos, utilizando un medio de cultivo definido (TCM 199) (Tissue Culture Medium, Sigma) con diferentes aditivos. El detalle de los tratamientos es el siguiente:

- Tratamiento N° 1: Testigo, sin aditivos.
- Tratamiento N° 2: 10 mM de Pentoxifilina (Trental, ICN Biomédicals) $C_{13}H_{18}N_4O_3$).
- Tratamiento N° 3: 6 mM de Pentoxifilina.
- Tratamiento N° 4: 10 mM de Cafeína (1,3,7-trimethylxantina, Sigma) ($C_8H_{10}N_4O_2$).
- Tratamiento N° 5: 6 mM de Cafeína.

Inmediatamente de disueltas las pastillas se colocaron en baño termostático a 37°C en atmósfera de aire, realizándose observaciones a los siguientes tiempos de cultivo postdescongelamiento: 0, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos. Se realizaron cinco repeticiones por tiempo dentro de cada tratamiento, totalizando 150 observaciones.

Las mismas fueron realizadas simultáneamente por tres técnicos experimentados, en pantalla de video, grabándose y almacenándose cada repetición debidamente identificada con una clave alfanumérica.

Se midió la motilidad progresiva de los espermatozoides, expresada en porcentaje de células móviles, y el vigor, relacionado con el tipo de movimiento y expresado en una escala de 5 puntos, detallada en el cuadro N° 1.

El análisis estadístico se realizó con un ANDEVA para un diseño completamente aleatorizado para cada tiempo en estudio, efectuándose posteriormente un test de Duncan para determinar entre cuáles tratamientos se encuentra la diferencia marcada. (se trabajó con el programa SAS).

Los gráficos se confeccionaron con los promedios obtenidos de las cinco repeticiones correspondientes a cada tiempo de observación.

RESULTADOS

El análisis de la varianza para motilidad y vigor se detallan en los cuadros N° 2 y 3 respectivamente. En los mismos se aprecia que las diferencias comienzan a hacerse significativas a partir de los 30' en el caso de la motilidad y a partir de los 120' en el caso del vigor.

En los cuadros 4 y 5 se resumen los valores promedio de motilidad y vigor determinados; con los mismos se confeccionaron los gráficos N° 1 y 2 respectivamente.

En virtud a los resultados obtenidos con el test de Duncan, se definieron dos grupos de tratamientos:

CUADRO N° 1:
EVALUACIÓN DE SEMEN CONGELADO: VIGOR
(BARTH A.D. 1990)

Puntaje	Tipo de Movimiento
0	Sin movimiento
1	Ligera ondulación de la cola, sin progresión.
2	Progresión lenta, incluyendo detención momentánea.
3	Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.
4	Movimiento progresivo rápido.
5	Movimiento progresivo muy rápido, células difíciles de visualizar.

CUADRO N° 2:
ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE LA MOTILIDAD
ESPERMÁTICA
Variable dependiente: MOTILIDAD.
Fuente de variación: TRATAMIENTOS.

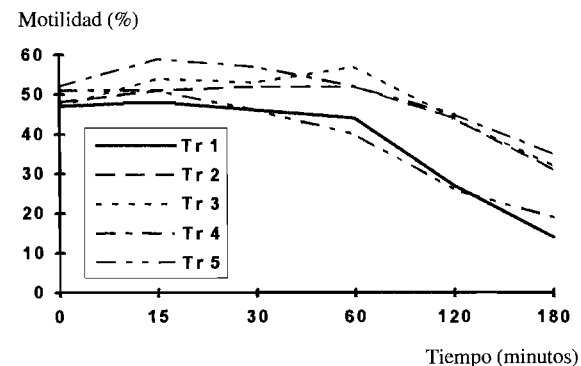
Tiempo minutos	Valor "F"	Pr > F	Significación est.
0	0,48	0,7884	n.s.
15	0,00	99,9999	n.s.
30	3,60	0,0228	*
60	5,80	0,0029	**
120	4,47	0,0096	**
180	4,00	0,0156	*

CUADRO N° 3:
ANÁLISIS DE LA VARIANZA DEL VIGOR
ESPERMÁTICO
Variable dependiente: VIGOR.
Fuente de variación: TRATAMIENTOS

Tiempo minutos	Valor "F"	Pr > F	Significación est.
0	1,00	0,4307	n.s.
15	0,00	99,9999	n.s.
30	0,00	0,0623	n.s.
60	1,60	0,2132	n.s.
120	4,38	0,0106	*
180	4,05	0,0145	*

Nota: n.s. (no significativo) - * (significativo, al 5%) - ** (altamente significativo, al 1%).

Gráfico N° 1: Valores promedio de Motilidad espermática en función al tiempo de cultivo.



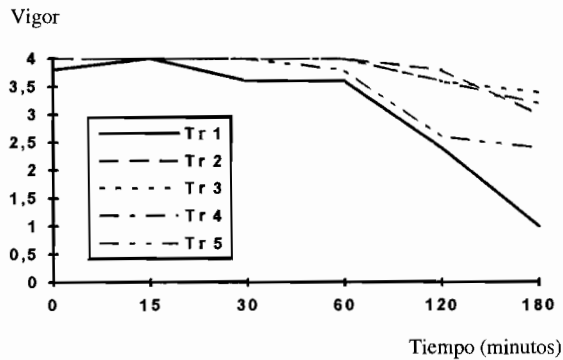
CUADRO N° 4:
VALORES PROMEDIO DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Tratamiento	Min. 0	Min. 15	Min. 30	Min. 60	Min. 120	Min. 180
1	47	48	46	44	27	14
2	48	51	52	52	44	31
3	47	54	53	57	44	32
4	52	59	57	52	45	35
5	51	51	46	40	26	19

CUADRO N° 5:
VALORES PROMEDIO DE VIGOR ESPERMÁTICO

Tratamiento	Min. 0	Min. 15	Min. 30	Min. 60	Min. 120	Min. 180
1	3,8	4	3,6	3,6	2,4	1
2	4	4	4	4	3,8	3
3	4	4	4	4	3,6	3,4
4	4	4	4	4	3,6	3,2
5	4	4	4	3,8	2,6	2,4

Gráfico N° 2: Valores promedio de Vigor espermático en función al tiempo de cultivo.



- Grupo 1, que agrupa a los de mejor comportamiento, constituido por la pentoxifilina y los 10 mM de cafeína (Tr. 2, 3 y 4).
- grupo 2, en el que se encuentra el testigo (Tr. 1) y aquel tratamiento que no presentó diferencia con el mismo, 6 mM de cafeína (Tr. 5).

En el Cuadro N° 6 se promediaron los valores de los

tratamientos intervinientes en cada grupo de los mencionados, detallándose la variación y la disminución de cada uno de ellos a lo largo del tiempo y la diferencia entre ambos grupos.

DISCUSIÓN

Las metilxantinas y sus derivados, como la cafeína y la pentoxifilina, producen incremento de la motilidad y el vigor de espermatozoides frescos, razón por la cual son utilizados para el tratamiento de casos de oligozoospermia y astenozoospermia en humanos (Aparicio y col., 1979) (Schill, 1982) (Schoenfeld C. y col., 1975) (Shen y col., 1991).

Esta mayor actividad espermática podría ser causada por el aumento del contenido de AMP cíclico, como consecuencia de la inhibición provocada por las metilxantinas sobre la fosfodiesterasa (Garbers y col., 1971b) (Stefanovich, 1973).

Este efecto estimulante y el mantenimiento del mismo resultan de interés para trabajos de FIV en que se utiliza semen congelado. No obstante, poca o nula estimulación se reportó con bajas concentraciones de

CUADRO N° 6:
PROMEDIOS DE GRUPOS DE TRATAMIENTOS, VARIACIONES, DISMINUCIONES Y DIFERENCIAS

	Min. 0	Min. 15	Min. 30	Min. 60	Min. 120	Min. 180
Grupo 1	49	54,5	54	53,5	44,3	32,5
Variación*	0	+11,2%	+10,2%	+9,2%	-9,6%	-33,7%
Disminuc.**	—	0	0,9%	1,5%	18,7%	40,3%
Grupo 2	49	49,5	46	42	26,5	16,5
Variación	0	+1%	-6,1%	-14,3%	-45,9%	-66,7%
Disminución	—	0	7,1%	15,1%	53,5%	66,7%
Diferenc. 1-2	0	5	8	11,5	17,8	16

Grupo 1: Tratamientos 2, 3 y 4.
Grupo 2: Tratamientos 1 y 5.

* Variación en función al valor obtenido en el minuto 0.
**Disminución en función al máximo valor obtenido.

cafeína (6 mM) usando semen bovino congelado (Wilde y col., 1989/90 y 1996).

Dosis bajas (6 ó 7 mM) de cafeína son efectivas para semen fresco (Singh y col., 1986) pero demostraron ser ineficientes para semen congelado, ya adicionada previo al congelamiento (Wilde y col., 1996) como al descongelamiento (Wilde y col., 1989/90). Sin embargo, según los presentes resultados, concentraciones mayores (10 mM) permitirían el mantenimiento de altos valores de motilidad y vigor por períodos más prolongados.

Las muestras adicionadas con pentoxifilina se comportaron de manera similar produciendo incremento de la actividad del semen criopreservado, no encontrando en este caso diferencias entre las concentraciones utilizadas.

Experiencias realizadas con concentraciones altas de cafeína no arrojaron diferencias significativas entre 10 y 20 mM agregados al semen fresco, pero determinaron problemas de toxicidad con cantidades mayores. En efecto, con 40 mM la hiperactividad lograda es menos manifiesta y con 80 mM se observa depresión en la motilidad espermática (El-Gaafary y col., 1990).

Al haberse realizado el ANDEVA para cada tiempo de observación en forma independiente, se pudo determinar en qué momento comienza a ser significativa la acción estimulante de los compuestos utilizados.

MOTILIDAD. A partir de los 30' las diferencias comienzan a ser significativas o altamente significativas, lo cual es coincidente con trabajos previos que encontraron diferencias a partir de los 60' (Fuse y col., 1993). Los aspectos más importantes a considerar son los siguientes:

1. El test de Duncan ubica en diferentes grupos a los tratamientos 4 (10 mM de cafeína) y 5 (6 mM de cafeína), lo cual indicaría diferencia significativa entre las distintas concentraciones de este compuesto.
2. En la mayoría de los casos el tratamiento 1 (testigo) también se ubica en grupo diferente a los tratamientos 2, 3 (pentoxifilina) y 4 (10 mM de cafeína).
3. En todos los casos los promedios más bajos corresponden a los tratamientos 1 (testigo) y 5 (6 mM de cafeína).
4. Los tratamientos con distintas concentraciones de pentoxifilina no arrojaron diferencias significativas, por lo que la utilización de 6 mM sería suficiente para provocar efectos estimulantes.

El agrupamiento determinado por el test de Duncan se observa fácilmente en los gráficos, donde se torna manifiesta la constitución de dos grupos definidos; por un lado los tratamientos con pentoxifilina y 10 mM de cafeína, con valores más altos, y por otro el

testigo y el de 6 mM de cafeína, con valores más bajos.

Del Cuadro N° 6 se desprende que la pentoxifilina y los 10 mM de cafeína permitirían mantener la motilidad de los espermatozoides en rangos confiables, para semen congelado utilizado *in vitro*, hasta 60' más que sin aditivos o con el agregado de 6 mM de cafeína. Resultaría de interés corroborar estos datos *in vivo*.

VIGOR. Las diferencias significativas en este caso se observan a los 120' y 180', ubicándose los tratamientos 1 (testigo) y 5 (6 mM de cafeína) en grupo distinto que los restantes, según el test de Duncan. Se confirmaría de esta manera la superioridad de los tratamientos 2 (10 mM de pentoxifilina), 3 (6 mM de pentoxifilina) y 4 (10 mM de pentoxifilina) sobre los mencionados en primer término.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el agregado de pentoxifilina (6 ó 10 mM) o de cafeína (10 mM) a medios de cultivo como el TCM 199, prolongarían la viabilidad de los espermatozoides manifestándose una marcada hiperactividad, traducida en aumento de la motilidad y el vigor. Esto permitiría utilizar dichos compuestos en trabajos relacionados con la FIV. Así mismo, la adición de las mencionadas metilxantinas, en las concentraciones estudiadas, a medios de uso habitual en inseminación artificial, prolongaría en el tiempo la viabilidad de los espermatozoides, manteniendo la calidad del semen por períodos más largos y mejorando las perspectivas de éxito de la inseminación.

RESUMEN

En el presente trabajo se probaron dos concentraciones de pentoxifilina (10 mM y 6 mM) y dos de cafeína (10 mM y 6 mM), adicionadas a un medio de cultivo definido de amplio uso en fertilización *in vitro* (FIV), TCM 199.

Se trabajó con un "pool" de pastillas de semen pertenecientes a 6 toros diferentes, descongelándose dos pastillas por repetición, realizándose 5 repeticiones. El semen reconstituido se colocó en baño a 37°C, observándose a distintos tiempos postdescongelamiento (0', 15', 30', 60', 120' y 180'). Se determinó el porcentaje de células móviles y el vigor de las mismas, en una escala de 5 puntos.

El análisis estadístico se realizó mediante una ANDEVA para un diseño completamente al azar y posteriormente se efectuó un test de Duncan.

Los resultados obtenidos indican que a partir de los 30' existirían diferencias significativas para motilidad entre los tratamientos con pentoxifilina y con 10 mM de cafeína respecto al testigo y al de 6 mM de cafeína. Similar respuesta se observa en el caso del vigor a partir de los 120'. Los tratamientos con diferentes concentraciones de cafeína arrojaron diferen-

cias significativas entre ellos, no así las distintas concentraciones de pentoxifilina.

Puede concluirse que el agregado de 6 mM de pentoxifilina o 10 mM de cafeína permitirían prolongar en el tiempo la viabilidad del semen congelado posteriormente a su reconstitución, resultando esto de interés para su utilización en FIV.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Ing. Zoot., M. Sc., Patricia Chagra Dib por su colaboración para la utilización del Programa Estadístico SAS.

REFERENCIAS

- APARICIO N.J., de TURNER E.A., SCHWARZSTEIN L. and TURNER D. 1979. Effect of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline on human sperm motility. *Andrología* 12: 49-54.
- BARTH A.D. 1990. Evaluación de semen bovino congelado. *CABIA* 21: 28-36.
- EL-GAAFARY M.N., DAADER A.H. and ZIEDAN A. 1990. Effects of caffeine on bull semen quality and sperm penetration into cervical mucus. *Animal Reproduction Science* 23: 13-19.
- FUSE H., SAKAMOTO M., OHTA S. and KATAYAMA T. 1993. Effect of pentoxifylline on sperm motion. *Archives of Andrology* 31: 9-15.
- GARBERS D.I., FIRST N.L., SULLIVAN J.J. and LARDY H.A. 1971a. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol. Reproduction* 5: 336-339.
- GARBERS D.L., LUST W.D., FIRST N.L. and LARDY H.A. 1971b. Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry* 10: 1825-1831.
- SCHILL W.B. 1982. Therapie der idiopathischen astheno and oligozoospermie mit pentoxifylline. *Fortschr. Med.* 100: 696-700.
- SCHOENFELD C., AMELARD R.D. and DUBIN L. 1975. Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. *Fertil Steril* 26: 158-161.
- SHEN M.R., CHIANG P.H., YANG R.C., HONG C.Y. and CHEN S.S. 1991. Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. *Br. Jour. Clin. Pharmacol.* 31: 711-714.
- SINGH S.D., ANSARI M.R. and BENJAMIN B.R. 1986. Effect of caffeine on motility of buffalo spermatozoa in vitro. *Andrologie* 18: 33-36.
- STEFANOVICH V. 1973. Effect of 3,7 - dimethyl - 1 - (5 - oxohexyl) - xanthine and 1 - hexyl - 3,7 - dimethyl - xanthine on cyclic AMP phosphodiesterase of the human umbilical cord vessels. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 5: 655-662.
- WILDE O.R., DELA VEGA A.C. y PARRA R.W. 1989-1990. Respuesta del semen descongelado en diluyentes cafeinados, *Rvta. Agron. N.O. Argent.* XXV (1-4) 65-83.
- WILDE O.R., DE LA VEGA A.C. y CRUZ M.L. 1996. Falla de la cafeína en realzar la motilidad (hiperactividad) en semen congelado. *Rvta. Agron. N.O. Argent.* XXVIII (1-4): 85-95.